

## Pin1の精子幹細胞および間葉系幹細胞の分化増殖制御機能の解明

著者	鈴木 充子
号	55
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1211号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126268">http://hdl.handle.net/10097/00126268</a>

すずき あつこ

氏 名（本 籍 地） 鈴木 充子

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1211 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 30 年 9 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論 文 題 目 Pin1 の精子幹細胞および間葉系幹細胞の分化増殖制御機能の解明

博士論文審査委員 （主査）教授 内田 隆史

教授 西森 克彦

准教授 原 健士朗

# 論文内容要旨

## Pin1 の精子幹細胞および間葉系幹細胞の 分化増殖制御機能の解明

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

鈴木 充子

指導教員

内田 隆史 教授

## Pin1 の精子幹細胞および間葉系幹細胞の 分化増殖制御機能の解明

### 序論

調節酵素の一つであり細胞周期調節因子として発見された Pin1 は、プロリン異性化酵素の一種で、タンパク質のリン酸化された Ser/Thr とそれに続く Pro 配列を認識しペプチド結合の *cis-trans* 異性化を触媒することで、リン酸化タンパク質の立体構造を制御している。Pin1 欠損マウスは死に至ることはないが、生理的機能低下がみられる。本研究では、表現型として顕著に現れる Pin1 欠損による精巣萎縮に着眼した。また Pin1 阻害による脂肪分化細胞の抑制にも焦点をあてた。どちらも幹細胞という共通点があり、精子幹細胞と間葉系幹細胞の生体内での Pin1 による分化制御の解明を目指した。

### 第1章 精子幹細胞における Pin1 の重要性を追求する

Pin1 欠損雄マウスの著しい精巣萎縮が確認されている。精原細胞の有糸分裂期に存在しかつ GFR $\alpha$ 1 (glial cell derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ 1)が発現している未分化型精原細胞を精原幹細胞 (SSCs)と呼んでいる。

過去に、Pin1 欠損マウスの精巣を用い GCNA1 で免疫染色した結果から、精原細胞の減少が精巣の萎縮をもたらしたという報告がある(Atchison ら 2003)。しかしながら、この GCNA1 は広い範囲での生殖細胞マーカーであり、精原幹細胞に言及することはできず、Pin1 欠損マウス精巣内での分子メカニズムは明らかではなく、分子基盤がよくわかっていない。また、加齢の Pin1 欠損マウス精巣には、精細管内で異常な精子形成が観察されている。

そこで本研究では、精子形成過程で特に、未分化型精原細胞に着目し精巣萎縮をもたらすその分子機構を明らかにすることを目的とした。そして、Pin1 は精原幹細胞の有糸分裂を促進し、その後の細胞分化促進にも関与している結果を報告する。

精巣の形態観察を示した Fig.1A は 38 週齢の精巣であり、WT (Pin1<sup>+/+</sup>)と KO (Pin1<sup>-/-</sup>)の大きさに顕著な差が見られる。この詳細を調べる為に経時的精巣重量を測定した結果を示した(Fig.1B)。その結果、16 週齢までは両者に差が見られなかったが、加齢につれて WT の精巣重量に変化は見られないのに対し、Pin1<sup>-/-</sup>では 16-38 週齢にかけて極端に減少し、その後も緩やかに減少していくことが観察された。

未分化型精原細胞は抗 PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein) 抗体により検出できる。生存する精細管内の抗 PLZF 抗体陽性細胞の数を調べた結果、WT と比較して Pin1<sup>-/-</sup>では少なく、さらに加齢に伴い減少し 92 週齢では消滅していた。さらに 92 週齢のマウスでは異常な精細管が観察され、抗 PLZF 抗体陽性細胞は存在しないが、

セルトリ細胞は確認できた(Fig.2A)。しかし、16-38 週齢ではその陽性細胞数の変化はなく、38 週齢後から徐々に減少していくグラフパターンは両者同じ形であった(Fig.2B)。つまり、WT と比べ  $\text{Pin1}^{-/-}$  の未分化型精原細胞の数は少ないが、その細胞が加齢に伴い減少するタイミングは同じであった。免染した精巣断面には顕微鏡視野内に精細管断面を多数観察できる。その精細管断面に一つ以上の抗 PLZF 抗体陽性細胞が存在する割合を計測した結果、 $\text{Pin1}^{-/-}$  精巣内では WT の半分の割合でしか存在しないことが明らかとなった(Fig.2C)。

精原幹細胞の数は生涯変化しないと考えられているが、 $\text{Pin1}^{-/-}$  では 34-38 週齢まではむしろ WT より多い傾向にあり、92 週齢までには著しく減少した(Fig.3A)。 $\text{Pin1}^{-/-}$  でも抗  $\text{GFR}\alpha 1$  抗体陽性細胞である As (単体で存在している) や Apr (架橋して二個繋がって存在している) の数に WT と比べ大きな差はなかった(Fig.3Ba,b)。しかしながら、いくつかの精細管では、肥大化した抗  $\text{GFR}\alpha 1$  抗体陽性細胞が観察された(Fig.3Bc-e)。さらに、細胞周期の M 期に特異的応答をする抗 phosphohistone H3 抗体を用い免疫染色を行った結果、抗  $\text{GFR}\alpha 1$  抗体陽性細胞でかつ抗 phosphohistone H3 抗体陽性細胞の割合は、WT で 16%に対し、 $\text{Pin1}^{-/-}$  では 32%であった (Fig.3C)。つまり繁殖期では幹細胞数は WT と比べ変化ないが、 $\text{Pin1}$  欠損による細胞周期遅延が起こり、さらに奇形を引き起こしていた。

これらの結果より、 $\text{Pin1}$  は未分化型精原細胞の分化を促進させる因子のひとつであり、さらに精原幹細胞では細胞周期を促進していると考えた。精原幹細胞の自己複製と分化の決定は、細胞周期において何らかの因子が関与していると考えている。そこに  $\text{Pin1}$  がどのような分子機構で作用しているのか解明していくことが今後の課題である。

## 第2章 天然物由来褐藻類ポリフェノールによる $\text{Pin1}$ 阻害

$\text{Pin1}$  は細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど、重要な生命現象に関与する蛋白質を制御していることから、創薬ターゲットとして注目されてきた。その中でも、 $\text{Pin1}$  の発現は高脂肪食給餌によって増加し、肥満や糖尿病に関与しているという報告がある。一方、健康志向が高まっている近年に注目されている食品成分であるポリフェノール類は、肥満や癌といった加齢疾患に有効であり、その効果は  $\text{Pin1}$  の持つ生理機能と共通点が多い。そこで本研究室では、天然物より  $\text{Pin1}$  阻害剤となる化合物のスクリーニングを行い、海藻成分より  $\text{Pin1}$  阻害活性を持つポリフェノールである 974-B を見出した。本研究では、その褐藻類ポリフェノールを用いマウス生体内での影響を調べた。

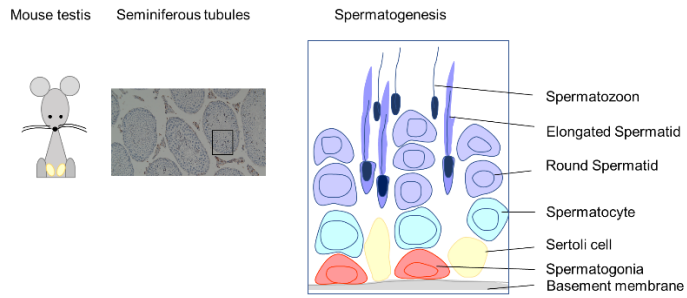
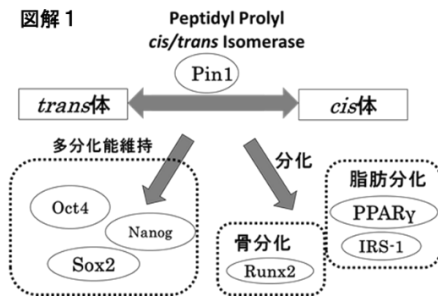
普通食給餌群を対照区として高脂肪食給餌群、さらに高脂肪食給餌かつ水の経口投与群を対照区とし褐藻類ポリフェノールの経口投与群で比較した。その結果、高脂肪食給餌群の体重は、普通食給餌群の体重増加に比べ大きな傾きで増加する一方、高脂肪食給餌にもかかわらず褐藻類ポリフェノールを経口投与することにより、体重増加が著しく

抑えられた。(Fig.4A)。実験開始 8 週間後に、全てのマウスを解剖し、皮下脂肪と内臓脂肪重量を測定した結果、体重増加が抑制された高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール経口投与群では脂肪重量も有意差ある減少を示した(Fig.4B)。さらに、解剖時に採取した血液解析の結果、高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール経口投与群の血中レプチンと総コレステロール量は、普通食給餌群と近い値まで回復していることが明らかとなった(Fig.5)。これは褐藻類ポリフェノール投与により脂肪細胞マーカー分子の発現レベルを変化させている可能性が示唆された。さらに、脂肪の組織化学的な観察を行った結果、高脂肪食給餌により肥大した脂肪細胞に対し、高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール投与群の脂肪細胞の大きさは、普通食給餌群により近いことが明らかとなった(Fig.6)。つまり、褐藻類ポリフェノールは生体内で脂肪細胞分化抑制効果があることが証明された。一方で褐藻類ポリフェノールの基礎的な機能を調べる為に、NIH3T3-L1 細胞を用い脂肪分化への影響を調べた結果、褐藻類ポリフェノール添加濃度が濃いほど、脂肪分化が強く抑制されていることがわかった。両者 *in vivo*、*in vitro* での褐藻類ポリフェノールの脂肪分化抑制効果が証明された。しかしながら、実際、褐藻類ポリフェノールが体内にどれだけ吸収されているのか確かめる方法がなく、今後の課題でもある。

さらに褐藻類ポリフェノールが活性阻害している Pin1 の脂肪細胞における分子生物学的研究の重要性を考え、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipoe-Derived Mesenchymal Stem Cell : ASC)の脂肪分化における Pin1 の影響を調べることにした。ASC は、自らの脂肪組織から直接採取を行うために ES 細胞や iPS 細胞のような倫理面、癌化の心配が少なく、再生医療の材料として臨床への応用が期待されている細胞である。不死化を目的として p53 ノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1 WT-ASC) の #5 株、p53/Pin1 ダブルノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1-KO ASC with mock)の #j mock 株および Pin1-KO ASC に Pin1 を過剰発現させた #j rescue 株(Pin1-KO with lentiviral Pin1)を使用した。この #j mock 株と #j rescue 株から RNA を抽出し、本研究室にて Filgen®に DNA マイクロアレイ受託解析を依頼した。データ解析の結果、Pin1 の高発現によって発現量が 2 倍以上減少したもの ( $\frac{\text{\#j rescue の遺伝子発現量}}{\text{\#j mock の遺伝子発現量}} \leq 0.5$  を 2DOWN として遺伝子の発現量に変化が見られるものとして Notch1 受容体のリガンドである jagged1 の減少があった。そこでその結合により誘導され切断された Notch intracellular domain (NICD)に着眼した。Pin1 と NICD の関係を調べる為に NICD を過剰発現させた ASC の作製を試みた。レンチベクターに導入した NICD コンストラクトが Fig.7A であり、Fig.7B では ASC に形質導入されたことを GFP 発光で顕微鏡下にて確認した。ASC の脂肪細胞分化誘導を行ったところ、NICD 過剰発現により、脂肪分化が抑制されていることが明らかとなった(Fig.8)。しかし、NICD タンパクの検出を試みているがまだ確立しておらず、今後の課題としている。一般的に、細胞の増殖が停止し細胞分化へと移行するといわれているが、NICD 過剰発現させた ASC の

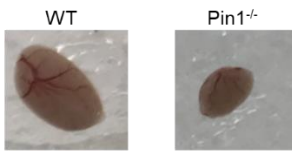
脂肪細胞分化誘導過程では、増殖が停止しない傾向がみられた。これら総合的に ASC Pin1(+)株では Notch シグナルが低活性化状態にあり脂肪細胞分化を促進しているという見解を得た。さらに精巣内で発現している Notch と精原幹細胞での Pin1 との相互関係および間葉系幹細胞という幹細胞共通の Pin1 制御機能を解明していくことが今後の大きな課題である。

図解 1

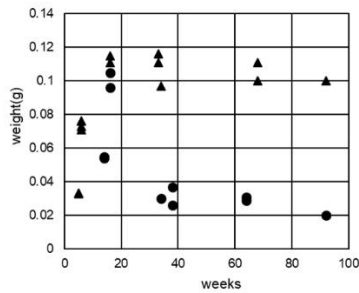


A

38 weeks testis



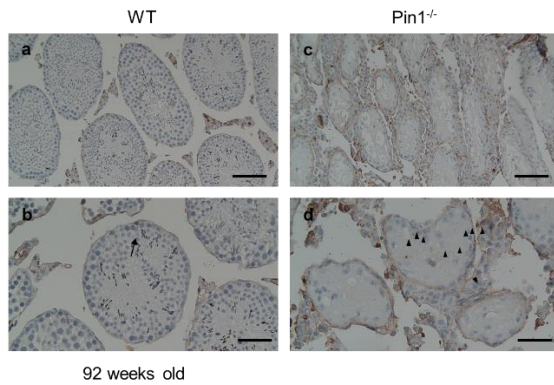
B

**Fig.1 Testicular atrophy of Pin1<sup>-/-</sup> mice.**

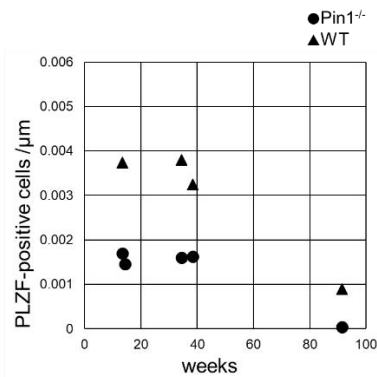
(A) Testes of 38 weeks old WT and Pin1<sup>-/-</sup> mice.

(B) Testes weights of WT (triangle) at 5, 6, 16, 33, 34, 68 and 92 weeks and Pin1<sup>-/-</sup> testes (circle) at 14, 16, 34, 38, 64 and 92 weeks.

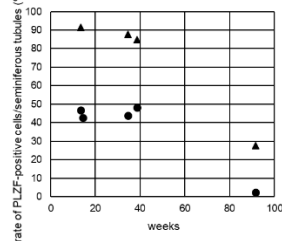
A



B

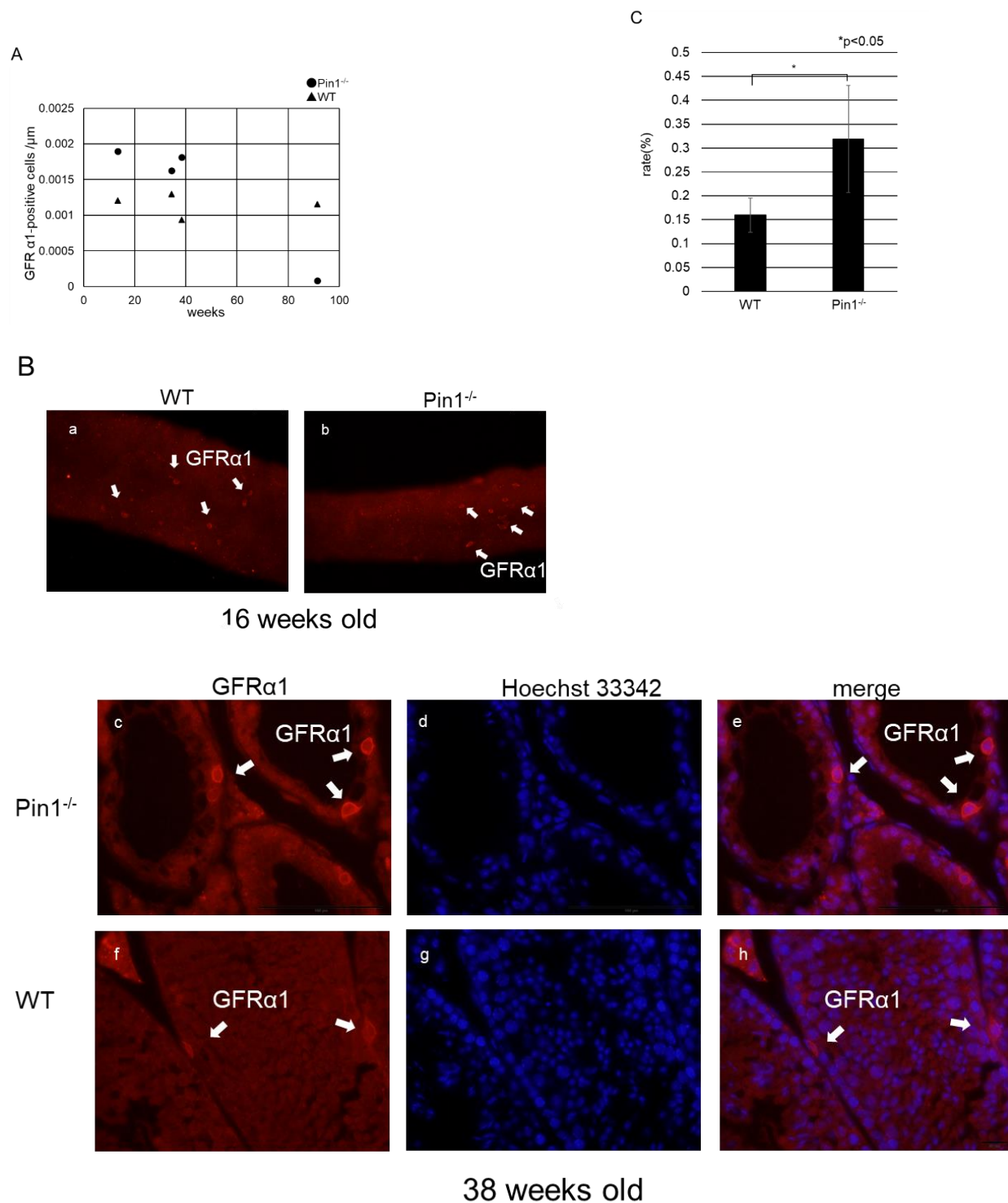


C

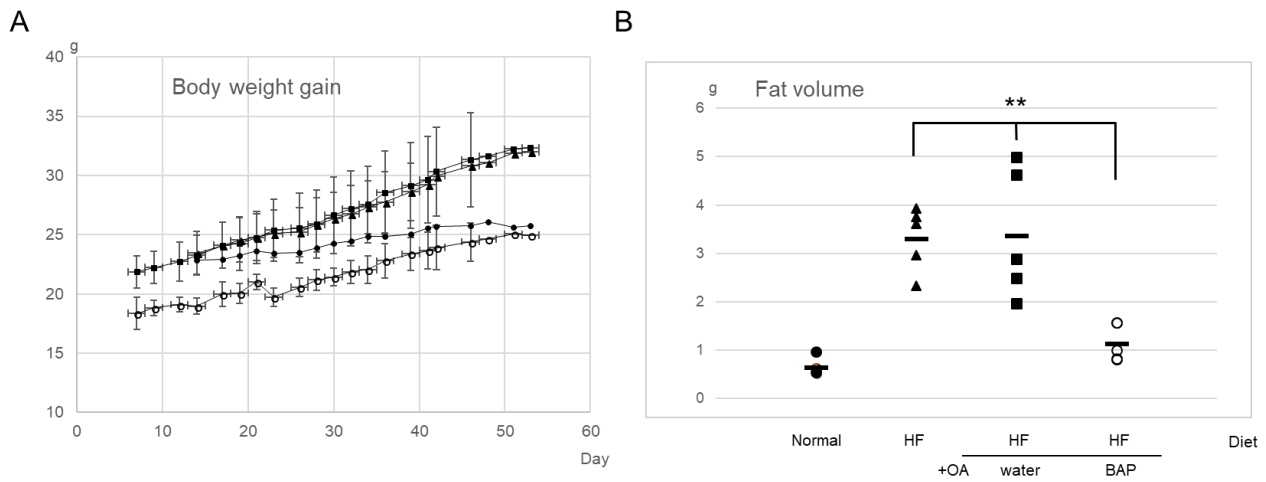


**Fig.2 PLZF-positive spermatogonia cells in seminiferous tubules of WT and Pin1<sup>-/-</sup> mice.** (A) Comparison of PLZF-positive spermatogonia cells in WT [A-a, b] and Pin1<sup>-/-</sup> mouse [A-c, d] testes of 92 weeks old. A PLZF-positive spermatogonia cell is shown by an arrow [A-b], and Sertoli cells were shown by wedges [A-d]. Magnification of 20x [A-a, c] and 40x [A-b, d]. Bar= 100 μm [A-a, c] and 50 μm [A-b, d]. (B) Frequency of PLZF-positive cells in the basement membrane of seminiferous tubules at each age (number/μm). (C) The ratio of seminiferous tubules that reside at least one PLZF-positive cell out of total tubules

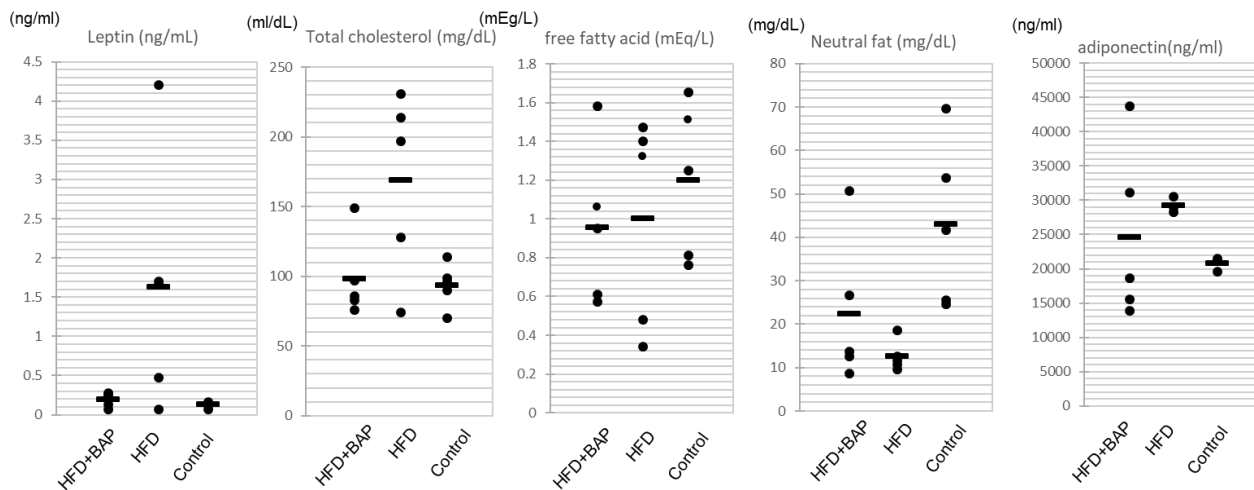




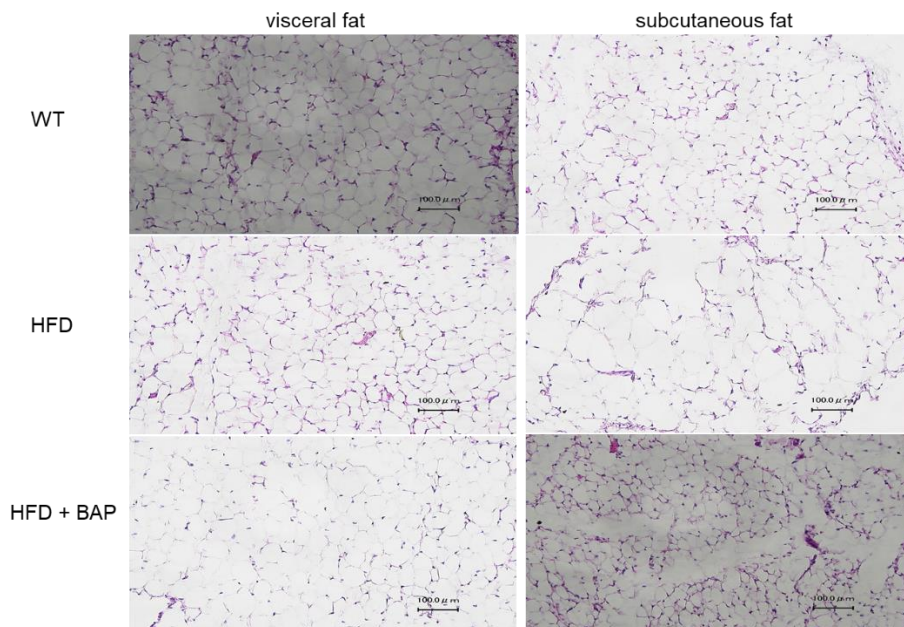
**Fig.3 GFRα1-positive spermatogonia in seminiferous tubules of WT and Pin1<sup>-/-</sup> mice.** (A) Frequency of GFRα1-positive cells in the basement membrane of seminiferous tubules at each age. (B) Whole-mount immunofluorescence staining of 16 weeks old testes with anti-GFRα1 antibody. GFRα1-positive cells were indicated by the arrows[B-a,b] and immunofluorescence staining of 5 μm section of 38 weeks old Pin1<sup>-/-</sup> (bar=100 μm) and WT (bar=20 μm) mice testes (60x) with anti-GFRα1 antibody [B-c,f], Hoechst 33342[B-d,g] and the merge [B-e,h]. (C) Comparison of the rates of GFRα1/phospho-histone H3 double positive spermatogonia in GFRα1-positive spermatogonia between Pin1<sup>-/-</sup> and WT mice testes (n=5).



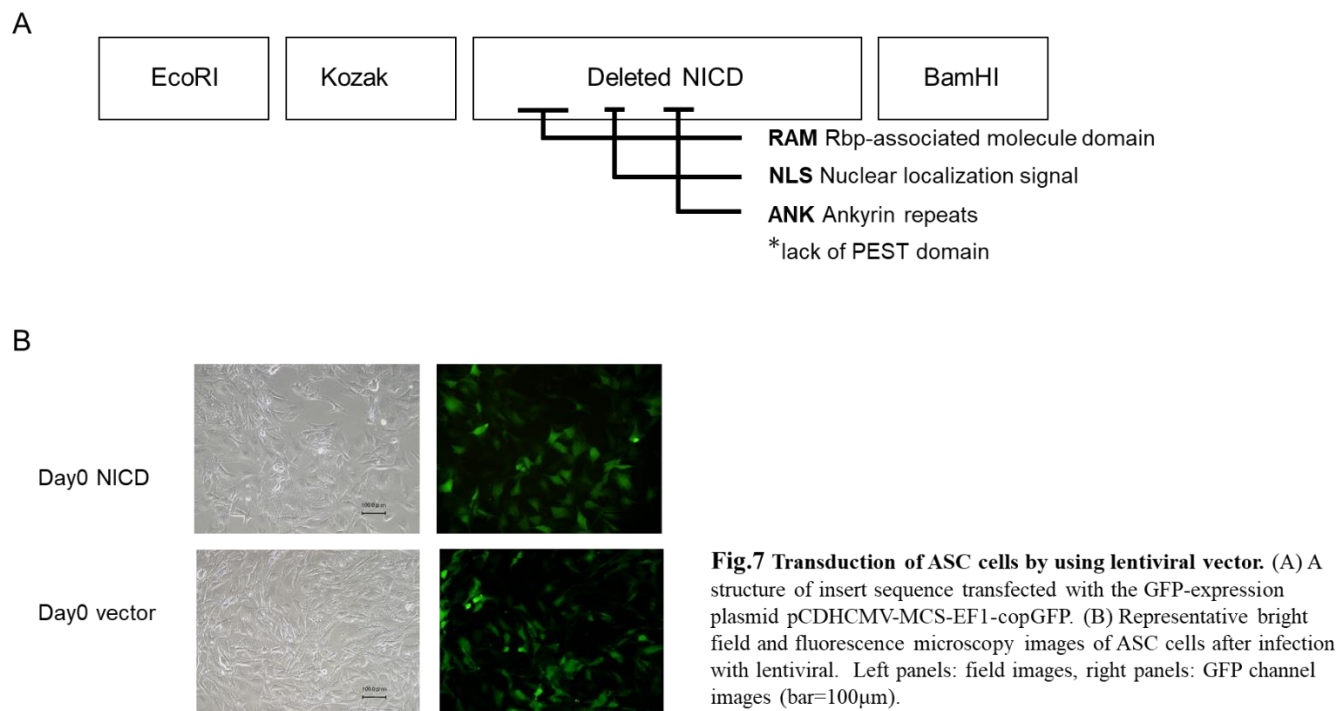
**Fig.4** Comparison of weights of mice fed with a normal diet, a high fat diet, a high fat diet plus water, and a high fat diet plus brown algae polyphenol. C57BL/6j male mice at 4-weeks old ( $n=5$ ) were fed with a normal diet (closed circle), a high fat diet (closed triangle), a high fat diet with oral administration of water (closed square), and a high fat diet with oral administration of brown algae polyphenol (open circle) (means  $\pm$  SD). Oral administration of brown algae polyphenol or water was started after the mice were provided water freely and no food for a day. 10  $\mu$ M of brown algae polyphenol was provided with the high fat diet for 8 weeks. (A) Measurement of body weight and (B) comparison of fat volume in mice ( $n=5$ ). Water for group3 and brown algae polyphenol for group4 were administered orally. The data were analyzed by 1-way Anova followed by Bonferroni post Hoc test. \*\* $P<0.01$ .



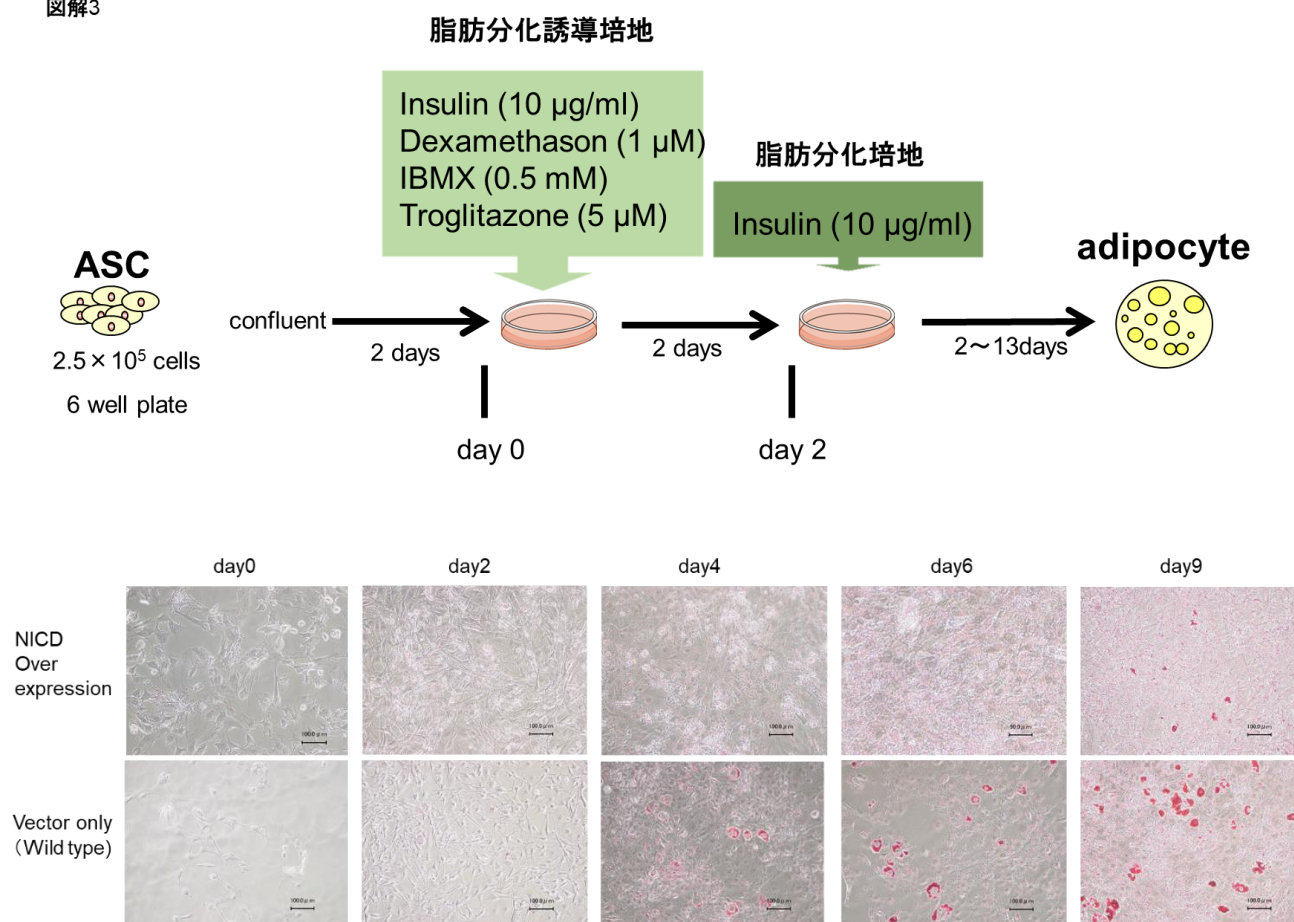
**Fig.5** Comparison of obesity marker levels in sera between mouse groups ( $n = 5$  each). Leptin (ng/ml), total cholesterol (mg/dl), free fatty acids (mEq/L), neutral fat (mg/dl), and adiponectin (ng/ml) in the serum of each mouse, 1: high fat diet + brown algae polyphenol, 2: high fat diet, 3: normal diet.



**Fig.6** Paraffin-embedded sections of visceral and subcutaneous fat tissue from mice fed with a normal diet (WT), high fat diet (HFD) and high fat diet plus brown algae polyphenol (HFD+BAP) were stained with hematoxylin and eosin (bar=100  $\mu$ m ).



図解3



**Fig.8 Comparison of ASC differentiation to adipocytes.** Comparison of adipocyte differentiation between the #5 ASC infected lentivirus transfected vector only and deleted NICD overexpression with lentivirus in #5 ASC.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	鈴木 充子
審 査 委 員	主査：教授 内田 隆史 副査：教授 西森 克彦 准教授 原 健士朗
学 位 論 文 題 目	Pin1 の精子幹細胞および間葉系幹細胞の分化増殖制御機能の解明
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>本論文で、鈴木充子は、プロリン異性化酵素 Pin1 欠損マウスの表現型として顕著な精巣萎縮と脂肪細胞数減少に着目して研究を進めた。</p> <p>第一に、Pin1 欠損雄マウスにおける著しい精巣萎縮が精原幹細胞の減少によりおこる現象であることを示し、Pin1 が精子幹細胞を維持するのに必要であることを解明した。精原幹細胞の分化増殖を Pin1 が正に制御していることを発見したことで、今後、Pin1 の哺乳類に対する生殖医療への応用、および、Pin1 阻害剤の避妊薬としての応用の可能性を示した。</p> <p>第二に、Pin1 が脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を正に制御していることから高脂肪食と同時に Pin1 阻害活性のある食品成分を同時に給餌することで肥満が抑制できると予想し検討した。マウスに高脂肪食を給餌すると普通食給餌群の体重増加に比べ体重・死亡が増加したが、褐藻類エキス（ポリフェノール）を高脂肪食と同時に経口投与することにより、体重・脂肪の増加が著しく抑えられた。給餌した量の褐藻類エキスは精子数の減少などの Pin1 欠損マウスにみられる表現型（毒性）調べた限り示さなかった。海藻（エキス）が肥満を抑制すること、またその機構として脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制することを解明し、海藻の食としての有用性について示すことができた。</p> <p>以上の内容について各委員らと質疑応答がされた。予備審で指摘された内容は改善されていたが、追加の動物実験に関しては時間的に間に合わなかったが、これからの残りの期間で明らかにすると説明した。発表技術に関しては、他分野の研究者に対してもより研究の内容を正確に伝える事ができるようにとの指摘をされたが、発表内容に関しては精密で的確な実験を行っている事が高く評価された。</p> <p>発表・討論の後、投票を行った。全委員（主、副査の3人とその他委員（山下教授、宮尾教授、原准教授、日高助教））が合格と判定した。</p> <p>博士論文は、すでに鈴木が筆頭著者として掲載されている Plos One と Biochem Biophys Res Commun の2報の内容に、さらに未発表の分子機構の結果も付け加えられており、審査委員3者から高い評価をされた。</p>	